


**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 49/00</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/22146</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/02559</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 49 971.2      19. November 1996 (19.11.96)    DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUTE FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURNER, Jonathan [DE/DE]; Ortwindstrasse 7, D-13465 Berlin (DE). DYRKES, Thomas [DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 25, D-16540 Hohenneuendorf (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). LICH, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Königstrasse 25, D-14109 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/02559</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 49 971.2      19. November 1996 (19.11.96)    DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUTE FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURNER, Jonathan [DE/DE]; Ortwindstrasse 7, D-13465 Berlin (DE). DYRKES, Thomas [DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 25, D-16540 Hohenneuendorf (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). LICH, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Königstrasse 25, D-14109 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE97/02559</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 49 971.2      19. November 1996 (19.11.96)    DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUTE FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURNER, Jonathan [DE/DE]; Ortwindstrasse 7, D-13465 Berlin (DE). DYRKES, Thomas [DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 25, D-16540 Hohenneuendorf (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). LICH, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Königstrasse 25, D-14109 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: OPTICAL DIAGNOSTIC AGENTS FOR DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES BY MEANS OF NEAR INFRARED RADIATION (NIR RADIATION)</p> <p>(54) Bezeichnung: OPTISCHE DIAGNOSTIKA ZUR DIAGNOSTIK NEURODEGENERATIVER KRANKHEITEN MITTELS NAHINFRAROT-STRAHLUNG (NIR-STRAHLUNG)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to compounds of formula (I): <math>F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)</math> wherein F is a colorant-signal molecule with a maximum absorption value ranging from 600 – 1200 nm; A is a <math>\beta</math>-amyloid plaque binding biomolecule; B is a <math>\beta</math>-amyloid plaque binding colorant; and W is a <math>\beta</math>-amyloid plaque binding hydrophilic low-molecular structural element. The invention also describes the use of these compounds in vivo and in vitro diagnosis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease by means of near infra-red radiation (NIR radiation) as a contrasting agent in fluorescence and transillumination diagnosis in the NIR range. Diagnostic agents containing said components are also disclosed.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I): <math>F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)</math>, worin F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm aufweist; A ein an <math>\beta</math>-Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist; B ein an <math>\beta</math>-Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist; W ein an <math>\beta</math>-Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles, niedermolekulares Strukturelement ist; sowie die Verwendung dieser Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten, wie der Alzheimerschen Krankheit, mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung) als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im NIR-Bereich und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.</p>				

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BG	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BJ	Benin	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BR	Brasilien	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BY	Belarus	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
CA	Kanada	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Optische Diagnostika zur Diagnostik neurodegenerativer  
Krankheiten mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung)**

5 Die Erfindung betrifft Verbindungen zur In-vivo- und In-  
vitro-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels  
Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung  
dieser Verbindungen als optische Diagnostika und diese  
Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

10

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist die häufigste Form  
der fortgeschrittenen Demenz bei älteren Menschen. Die  
Häufigkeit des Auftretens der AD steigt mit dem Alter der  
Patienten und erreicht Werte von 40%-50% in der Alters-  
15 gruppe zwischen 85 und 90 Jahren. Die AD kann nur post  
mortem durch die Untersuchung der Gehirne der Patienten  
bei einer Autopsie mit Sicherheit diagnostiziert werden.  
Die Gehirne der Alzheimer-Patienten enthalten viele cha-  
rakteristische Amyloid-Plaques im neuronalen Gewebe und  
20 in der Umgebung von Blutgefäßen, die von dystrophierten  
Neuriten und neurofibrilliären "Tangles" umgeben sind.  
Ferner weisen die Gehirne der Alzheimer Patienten eine  
geringe Zahl von Synapsen auf. Im fortgeschrittenen Sta-  
dium der Krankheit ist eine weitreichende Degeneration  
25 neuronaler Strukturen und eine signifikante Abnahme des  
Gehirnvolumens festzustellen (Wiesniewski, H.M., Weigel,  
J., Alzheimer's disease neuropathology. Current status of  
interpretation of lesion development. Ann NY Acad Sci  
1992, 673:270-84)

30

Die Amyloid-Plaques bestehen unter anderem aus dem Amy-  
loid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ), einem aus 40 bis 42 Aminosäuren be-  
stehenden Fragment des  $\beta$ -Amyloid Vorläuferproteins (APP)  
(Master, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., et al. Amyloid  
35 plaque core protein in Alzheimer disease and Down syn-  
drome. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82:4245-9; Kang, J.,

Lemaire, H.G., Unterbeck, A. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 1987, 325:733-6). Die Zahl der Plaques korreliert nicht mit dem Grad der fortgeschrittenen Demenz, ist aber ein frühes und sicheres Diagnostikum für das Auftreten der Alzheimerschen Krankheit. Dies führt zur Hypothese, daß die ersten Ablagerungen von Aß lange vor der Manifestation der AD stattfinden und bevor die ersten klinischen Symptome auftreten (Hardy, L., Allsop, D., Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci 1991, 12:383-8).

Eine Methode, die aber die Amyloid-Plaques quantitativ vor dem Tod des Patienten frühzeitig erfaßt, hätte großen Einfluss auf die weitere Erforschung der AD und auf die Entwicklung von neuen wirksamen Therapiekonzepten gegen die AD.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existiert kein direkter Nachweis der Amyloid-Plaques in den Gehirnen der AD-Patienten. Das Ausmaß der AD wird heute nur indirekt anhand des Gehirnvolumens oder von Stoffwechselstörungen betroffener Gehirnbereiche (MRT und PET) diagnostiziert. Der gravierende Nachteil dieser Methoden ist aber der nur indirekte Nachweis der AD, welcher oft mit hohen statistischen Schwankungsbreiten der Ergebnisse verbunden ist. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methoden gegenüber einem direkten Nachweis der Amyloid-Plaques ist daher als gering einzuschätzen.

Es sind mehrere Verfahren zur Durchstrahlung und bildgebenden Diagnose von biologischen Geweben mit langwelligen Licht des Wellenlängenbereiches von 600 bis 1200 nm (Nah-Infrarot-Diagnostik) bekannt. Da biologisches Gewebe eine relativ hohe Durchlässigkeit für langwelliges Licht die-

ses Spektralbereiches besitzt, steht dem Diagnostiker hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Ultraschalldiagnostik, ein weiteres Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung (Haller, E.B. Time-resolved transillumination and optical tomography. J Biomed Optics 1996, 1:7-17). Die Verwendung von NIR-Strahlung zur ortsabhängigen Aufzeichnung von Blutfluß und Oxygenierungsgrad im Gehirn von Säuglingen durch die Detektion der Absorption von Hämoglobin/Deoxyhämoglobin ist ein seit Jahren bekanntes und angewandtes Verfahren (Jöbsis, F.F., Noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. Science 1977, 198:1264-67; Chance, B., Leigh, J.S., Miyake, H. et al. Comparison of time-resolved and unresolved measurements of deoxyglobin in brain. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4971-75; Benaron D.A. et al. Optical time-of-flight and absorbance imaging of biological media. Science 1993, 33: 369A.).

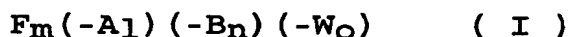
In der Nah-Infrarot-Diagnostik kann sowohl die Detektion der nicht absorbierten Strahlung in Form einer Transmissionsdarstellung als auch die nach Bestrahlung mit nahinfrarotem Licht emittierte Fluoreszenzstrahlung gewebespezifische Informationen liefern.

Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das Problem nimmt mit wachsender Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlich limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen werden.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Verbindungen der allgemeinen Formel I



10

worin

F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm aufweist,

15

A ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist,

B ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist,

W ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles,

niedermolekulares Strukturelement ist,

20

m für die Zahl 1 oder 2 steht oder, mit der Maßgabe, daß n und o Null bedeuten, für eine ganze Zahl 3 - 20 steht,

l und n unabhängig voneinander für eine Zahl 0, 1 oder 2 stehen,

25

o für eine ganze Zahl 0, 1, 2, 3 oder 4 steht,

mit der Maßgabe, daß die Summe aus l, n und o  $\geq 1$  ist

sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

30

zur Verfügung gestellt werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich die erfindungsgemäßen Verbindungen an die Amyloid-Plaques oder Bestandteile der Amyloid-Plaques lagern, binden oder dort anreichern und damit zu einer Vereinheitlichung und

35

Erhöhung der Absorption und Fluoreszenz dieser zu detektierenden Areale führen.

Die In-vivo-Detektion von  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen unter Verwendung von NIR-Strahlung erfordert Farbstoffe als Kontrastmittel, die im Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm eine hohe Absorption und Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und selektiv an  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen binden.

Farbstoffe aus der Klasse der Polymethine besitzen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften, die durch hohe molare Absorptionskoeffizienten zwischen 600 und 1200 nm und hinreichende Fluoreszenzquantenausbeuten charakterisiert sind. Farbstoffe dieser Klasse verfügen in der Regel über eine hohe Photostabilität.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß zur Verbesserung der Differenzierung zwischen normalem und erkranktem Gewebe Fluoreszenzfarbstoffe geeignet sind, die sich im erkrankten Gewebe anreichern oder an pathologisch veränderten Gewebekomponenten selektiv binden und ein spezifisches Absorptions- und Emissionsverhalten besitzen.

In der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I an die  $\beta$ -Amyloid-Plaques binden. Die durch Absorption des Farbstoffes bewirkte Änderung des (gestreuten) eingestrahlten Lichtes und/oder die durch die Anregungsstrahlung induzierte Fluoreszenz wird detektiert und liefert die eigentlichen gewebespezifischen Informationen, die eine Aussage über den Grad der pathogenen Veränderung ermöglichen.

Erfindungsgemäß werden solche Farbstoffe als Signalmoleküle F verwendet, die kovalent mit selektiv an  $\beta$ -Amyloid-

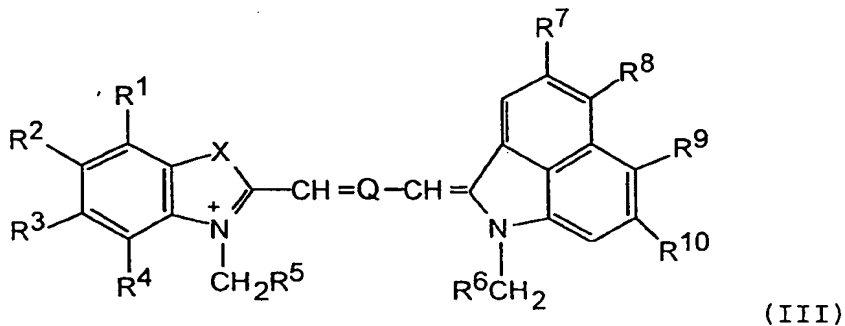
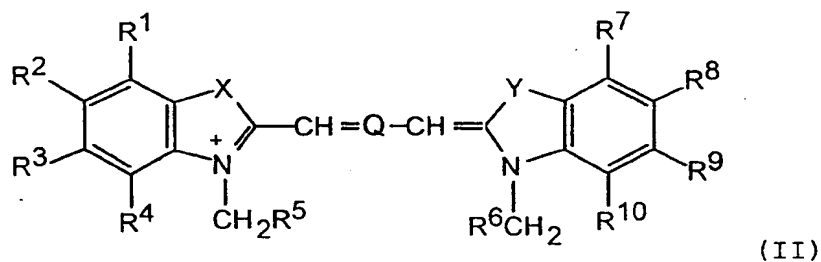
Plaques bindende Strukturen verknüpft bzw. mit derartigen Strukturen substituiert sind.

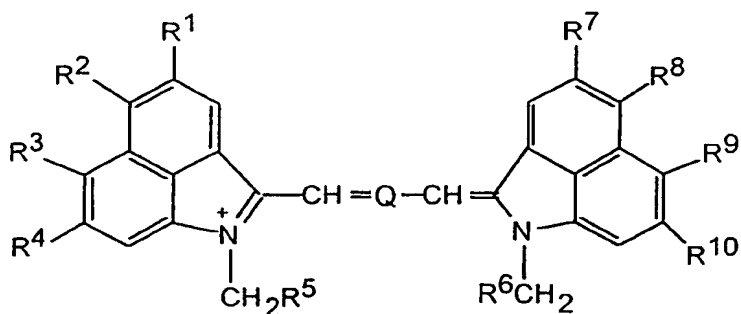
Erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I

- 5 sind solche, in denen beispielsweise
- a) 1 und n Null bedeuten, m für eins und o für 1-4 steht, oder
- b) n und o Null bedeuten, m für 3-20 und l für 1-2 steht, oder
- 10 c) 1 und o Null bedeuten, m für 1-2 und n für 1-2 steht, unter der Maßgabe, daß die Summe aus n und m kleiner gleich 3 ist.

- 15 Bevorzugt sind erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht.

- 20 Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F für einen Cyanin-, Squarilium- oder Croconiumfarbstoff der allgemeinen Formeln II - IV





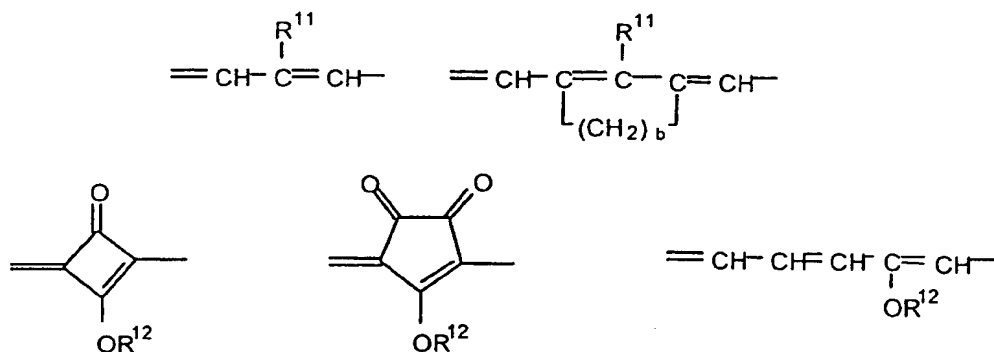
(IV)

worin

- 5         $R^1$  bis  $R^4$  und  $R^7$  bis  $R^{10}$  unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest  $-\text{COOE}^1$ ,  $-\text{CONE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{NHCOE}^1$ ,  $-\text{NHCONHE}^1$ ,  $-\text{NE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{OE}^1$ ,  $-\text{OSO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$ ,  $-\text{E}^1$ ,
- 10        wobei  $\text{E}^1$  und  $\text{E}^2$  unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{50}$ -Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische
- 15        oder gesättigte zyklische  $\text{C}_5$ - $\text{C}_6$ - oder bityklische  $\text{C}_{10}$ -Einheiten formen können, steht, und wobei die  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{50}$ -Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist,
- 20        stehen, und wobei jeweils benachbarte Reste  $R_1 - R_4$  und/oder  $R_7 - R_{10}$  unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,
- 25        oder für eine Bindung an A, B oder W stehen,

$R^5$  und  $R^6$  unabhängig voneinander für einen Rest  $-\text{E}^1$  mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -Sulfoalkylkette stehen,

Q ein Fragment



5

worin

R<sup>11</sup> für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -OE<sup>1</sup> oder -E<sup>1</sup>, wobei E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> die oben

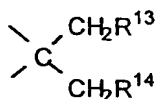
10

angegebene Bedeutung haben, steht, R<sup>12</sup> für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E<sup>1</sup> mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

15

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet, darstellt,

X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



20

worin

R<sup>13</sup> und R<sup>14</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R<sup>13</sup> und

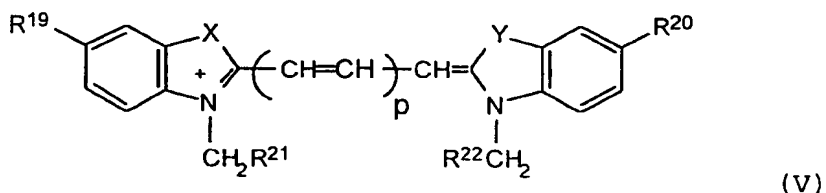
25

$R^{14}$  unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können, bedeuten,

5 steht.

Insbesondere bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel V

10



worin

p eine ganze Zahl 2 oder 3 bedeutet,

15

X und Y unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stehen,

20

$R^{19}$  und  $R^{20}$  unabhängig voneinander einen Rest -COOE<sup>1</sup>, -CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -NHCOE<sup>1</sup>, -NHCONHE<sup>1</sup>, -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -OE<sup>1</sup>, -OSO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -E<sup>1</sup>, wobei E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> die oben angegebene Bedeutung haben, mit der Maßgabe, daß E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> nicht gleichzeitig Wasserstoffatome sind, darstellen,

25

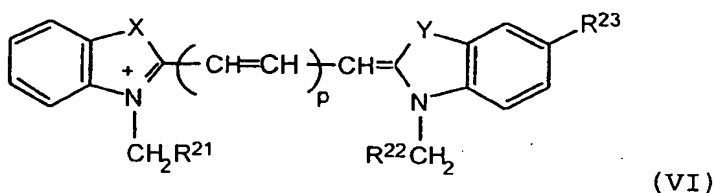
$R^{21}$  und  $R^{22}$  unabhängig voneinander für einen Rest -E<sup>1</sup> mit der oben angegebenen Bedeutung, für eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Sulfoalkylkette

30

oder  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$ , E<sup>1</sup> oder E<sup>2</sup> für eine Bindung an A, B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung stehen,

darstellt.

Insbesondere bevorzugt sind ferner Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Cyaninfarbstoff der  
5 allgemeinen Formel VI



worin

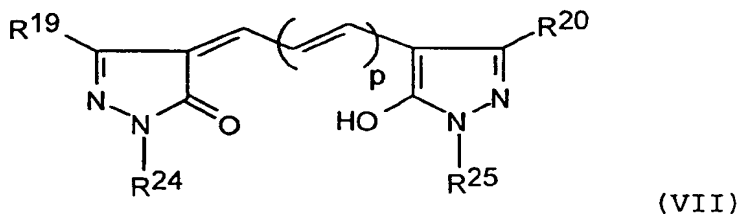
10 p, X, Y, R<sup>21</sup> und R<sup>22</sup> die oben angegebene Bedeutung haben,

R<sup>23</sup> für -OE<sup>3</sup>, -COOE<sup>3</sup>, -CONHE<sup>3</sup>, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NHE<sup>3</sup>, -  
CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-OE<sup>3</sup>, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-COOE<sup>3</sup> oder -  
15 CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-CONHE<sup>3</sup> steht, worin  
E<sup>3</sup> für ein Mono-, Oligo- oder Polysaccharid mit mindestens einem Rest -OSO<sub>3</sub>H steht,

darstellt.

20

Insbesondere bevorzugt sind außerdem Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Oxonolfarbstoff der allgemeinen Formel VII,



25

worin

p, R<sup>19</sup> und R<sup>20</sup> die oben angegebene Bedeutung haben,

R<sup>24</sup> und R<sup>25</sup> unabhängig voneinander für einen einfach bis dreifach mit Hydroxy-, Carboxy-, Sulfat-, Sulfonat, Alkyl- oder Alkoxy- oder Carbonsäureesterresten  
5 substituierten Phenylring stehen,

darstellt.

Erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I  
10 sind solche, in denen A beispielsweise für Antikörper, Antikörperfragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder  
15 verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

Bevorzugte Peptide sind das  $\beta$ -Amyloid 1-40, 1-42 und 1-43, sowie Teilstrukturen und Derivate derselben. Besonders bevorzugt sind die  $\beta$ -Amyloide und Teilstrukturen der  
20  $\beta$ -Amyloide, die mit der Aminosäure Cystein modifiziert sind, wobei die Bindung zum F über die Sulfhydrylgruppe des Cysteins mittels einer Maleimidostruktur erfolgt.

25 Monomere Aminosucker sind beispielsweise Glucosamin, Galaktosamin, Mannosamin, Gulosamin, Fucosamin, 3-Amino-3-desoxy-ribose, Kanosamin, Mycosamin, Mycaminose, Desosamin, Rhodosamin, 6-Amino-6-desoxy-glucose, Neosamin, Paromose.

30 Aminosucker-carbonsäuren sind beispielsweise Glucosaminsäure, Glucosaminuronsäure, Muraminsäure, Trehalosamin, Chondrosin und -derivate, Chitotriose.

Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in  
35 denen die Bindung an F zwischen Aminogruppe des Zuckers

und Carboxygruppe des Farbstoffes unter Bildung einer Amidgruppe erfolgt ist.

5 Bevorzugt sind außerdem Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Mono-, Di-, Tri- und Oligosacchariden für A, dessen glycosidische Hydroxygruppe in eine Aminogruppe übergeführt wurde, wobei die Kopplung an eine Carboxygruppe des Farbstoffes F unter Bildung einer Amidgruppe erfolgt ist.

10

Mono- bis oligomere Saccharide sind Aldo- und Ketotriosen bis Aldo- und Ketoheptosen, Ketooktosen und Ketononosen, Anhydrozucker, Cyclite, Amino- und Diaminozucker, Desoxyzucker, Aminodesoxyzucker, Monocarbonsäurezucker, Amino-  
15 zucker-carbonsäuren, Aminocyclite, Phosphor-enthaltende Derivate der Mono- bis Oligomere.

Beispiele für geeignete Polysaccharide sind Fucoidan, Arabinogalactan, Chondroitin und -sulfate, Dermatan, Heparin, Heparan, Heparitin, Hyaluronsäure, Keratan, Polygalacturonsäure, Polyglucuronsäure, Polymannuronsäure, Inulin, Polylactose, Polylactosamin, Polyinosinsäure, Polysucrose, Amylose Amylopektin, Glycogen, Nigeran, Pullulan, Asparagosin, Sinistrin, Sitosin, Galactocaulose, Luteose, Galactan, Mannane, Guaran, Glucomannane, Galactoglucomannane, Phosphomannane, Fucane, Pektine, Cyclodextrine und die chemisch und/oder enzymatisch hergestellten  
25 Derivate, Abbau- und Spaltprodukte der hochmolekularen Verbindungen.

30

Besonders bevorzugte Mono-, Oligo- und Polysaccharide sind sulfatierte bzw. polysulfatierte Strukturen.

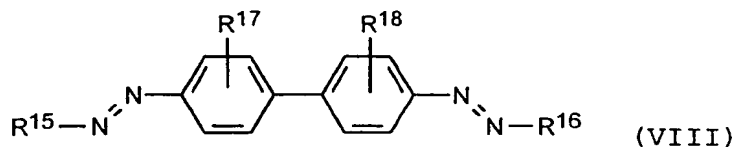
Sulfatierte Strukturen sind beispielsweise Glucosamin-3-sulfat, Glucosamin-6-sulfat und solche Strukturen, die  
35 sich durch Sulfatierung mit geeigneten Reagenzien aus den

oben beschriebenen Mono-, Di-, Tri- bis Oligo-, sowie Polysacchariden erhalten lassen

Sulfatierungen beispielsweise nach Jaurand, G., et al., Carbohydrate Research 1994, 255:295-301; Böcker, T., et al., Carbohydrate Research, 1992, 230: 245-256.

Erfindungsgemäß selektiv an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindende Farbstoffstrukturen B sind Diazofarbstoffe, die kovalent an die Signalmoleküle gebunden sind. Geeignete Diazofarbstoffe sind beispielsweise Kongorot, Chrysamin G, Evans Blue, Chicago Sky Blue 6B, Direct Red<sup>®</sup>-Farbstoffe, Direct Yellow<sup>®</sup>-Farbstoffe, Ponceau<sup>®</sup>-Farbstoffe, Reactive Black 5, Calcion.

Bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel I sind solche, in denen B einen Diazofarbstoff der allgemeinen Formel VIII



worin

R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup> unabhängig voneinander für einen mit einer oder mehreren Hydroxy-, Carboxy-, Amino-, Sulfonsäure-, Alkoxycarbonyl-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Alkoxy-, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen im Alkylrest, oder Arylsulfonylgruppen, mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen im Arylrest, substituierten Phenyl- oder Naphthylrest, oder für einen Farbstoff F, steht,

R<sup>17</sup> und R<sup>18</sup> unabhängig voneinander für einen Hydroxy-, Carboxy-, Sulfonsäure-, Alkyl-, Alkoxyrest, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, stehen, darstellt.

5

Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I sind ferner solche, in denen W für einen Rest -OSO<sub>3</sub>H oder -SO<sub>3</sub>H, einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkynyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest mit bis zu 60 C-Atomen, welcher mit bis zu 5 Hydroxygruppen, bis zu 3 Carbonsäuregruppen und mindestens einem Rest -OSO<sub>3</sub>H oder -SO<sub>3</sub>H substituiert ist, steht.

10

15

Bevorzugt sind solche Verbindungen nach der allgemeinen Formel I, in denen W eine sulfatierte Struktur bedeutet, die sich durch Sulfatierung entsprechender Hydroxyverbindungen darstellen läßt.

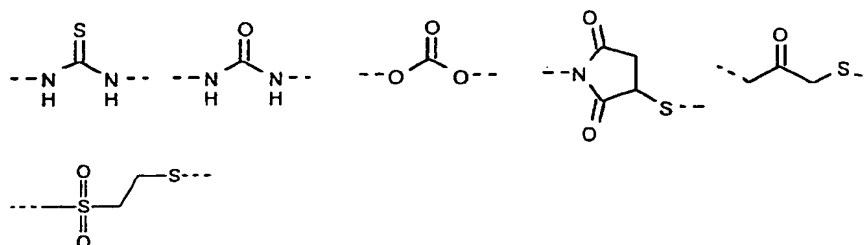
20

Geeignet sind beispielsweise Aminoalkohole, wobei zwischen Aminogruppe und Carboxygruppe des Farbstoffes unter Bildung einer Amidgruppe die Verknüpfung erfolgt ist und die Hydroxygruppen sulfatiert sind. Beispiele für Aminoalkohole sind 2-Amino-1-ethanol, 3-Amino-1-propanol, 4-Amino-1-butanol, 5-Amino-1-pentanol, 6-Amino-1-hexanol, 3-Amino-1,2-propandiol, 2-Amino-1,3-propandiol, 3-Amino-1,2,4-butantriol, Hydroxyaniline, 4-Aminoresorcin.

25

30

Signalmolekül und spezifisch bindende Struktureinheit sind über übliche funktionelle Gruppen miteinander verbunden. Solche Gruppen sind beispielsweise Ester, Ether, sekundäre und tertiäre Amine, Amide und im folgenden aufgeführte Strukturen



- Die Darstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I erfolgt durch Modifikation von Polymethinfarbstoff-Grundkörpern, welche koppelbare Funktionalitäten (z. B. Carboxyl-, Amino-, Hydroxylgruppen) enthalten, nach den dem Fachmann bekannten Verfahren.
- 5
- 10 Diese Gruppen werden entsprechend unter Erhalt der Struktur der Ausgangsverbindungen, in an sich bekannter Weise durch Reaktion mit entsprechenden Substituenten modifiziert.
- 15 Die Synthese der Polymethinfarbstoff-Grundkörper erfolgt nach literaturbekannten Methoden, beispielsweise F.M. Hammer in The Cyanine Dyes and Related Compounds, John Wiley and Sons, New York, 1964; Cytometry, 10, (1989), 3-10; 11 (1990) 418-430; 12 (1990) 723-30; Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11, Anal. Biochem. 217 (1994) 197-204, Tetrahedron 45 (1989) 4845-66, EP-0 591 820 A1, J. Org. Chem. 60 (1995) 2361-95.
- 20

- Die Darstellung der erfindungsgemäßen Farbstoff-Biomolekül-Addukte (l ungleich Null in der allgemeinen Formel I) erfolgt durch Umsetzung des Farbstoffes mit einem Biomolekül A nach literaturbekannten Methoden. Die Farbstoffe müssen dazu koppelbare Reaktivgruppen besitzen bzw. muß der Farbstoff durch Generierung dieser Gruppen in-situ oder zuvor aktiviert werden. Gegenüber Amino- und Sulfhydrylgruppen eines Biomoleküls reaktive Gruppen sind beispielsweise N-Hydroxysuccinimidylester, N-Hydroxy-succin-
- 25
- 30

imidylester-3-sulfat, Isothiocyanate, Isocyanate, Maleimid-, Halogenacetyl-, Vinylsulfongruppen. Die Kopplung erfolgt vorzugsweise in wässrigem Medium. Der Beladungsgrad ist dabei durch die Stöchiometrie und Reaktionszeit steuerbar. Literatur: Synth. Commun. 23 (1993) 3078-94, DE-OS 3912046, Cancer Immunol. Immunother. 41 (1995) 257-263, Cancer Research 54 (1994) 2643-49.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vitro-Diagnostik.

Dazu werden Gewebeproben oder Biopsieproben gewonnen und auf ihren Gehalt an  $\beta$ -Amyloid-Faltblattstrukturen untersucht werden.

Überraschenderweise binden die erfindungsgemäßen Farbstoffe selektiv an die zu untersuchenden Proben und erlauben eine Auswertung anhand der spezifisch emittierten Fluoreszenz im nahinfraroten Spektralbereich.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner auch diagnostische Mittel zur In-vivo-Diagnostik, welche Verbindungen der allgemeinen Formel I zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthalten.

Erfindungsgemäß wird dem Gewebe bei der Verwendung zur In-vivo-Diagnostik eine oder mehrere der Substanzen, vorzugsweise intrathekal, intralumbal oder intravenös, zugeführt und Licht aus nahinfraroten Spektralbereich einge-

strahlt. Das nicht absorbierte, gestreute Licht und/oder die vom Farbstoff emittierte, gestreute Fluoreszenzstrahlung werden gleichzeitig/einzeln registriert. Bevorzugt sind die Methoden, bei denen das Gewebe großflächig be-  
5 strahlt und die Fluoreszenzstrahlung örtlich aufgelöst durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera dargestellt wird oder die abzubildenden Gewebeareale mit einem Lichtleiter abgerastert und die erhaltenen Signale rechnerisch in ein synthetisches Bild umgesetzt werden. Darüberhinaus kann  
10 die Fluoreszenz spektral und/oder phasenselektiv sowie stationär und/oder zeitaufgelöst ausgewertet werden.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen beispielsweise gegenüber radiodiagnostischen Verfahren  
15 liegt darin, daß bei Verwendung stabiler Farbstoffe das Fluoreszenzsignal auch nach längeren Zeiträumen nach Applikation durch Anregung des Farbstoffes erzeugt und detektiert werden kann. Es steht ein längeres Zeitfenster für die Diagnose zur Verfügung, da Limitationen bei-  
20 spielsweise durch Zerfallshalbwertszeiten nicht vorhanden sind.

Mit der erfindungsgemäßen Verwendung wird eine nicht invasive diagnostische Methode zur Verfügung gestellt, die  
25 den direkten Nachweis der Amyloid-Plaques in-vivo ermöglicht.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

30 Beispiel 1:

Darstellung von N-(2,3-Disulfato)propyl-1,1'-Bis-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Trinatrium-  
salz

35

- 1) 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidylester, Natriumsalz

Zu einer Lösung von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-  
5 butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 0,1 g (0,9  
mmol) N-Hydroxysuccinimid in 30 ml wasserfreiem DMF wer-  
den bei 0 °C unter Argon 0,15 g (0,75 mmol) N,N'-Dicyclo-  
hexylcarbodiimid in 5 ml getropft. Es wird 72 h bei Raum-  
temperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel im  
10 Hochvakuum bei 40 °C bis auf ca. 5 ml abgedampft und der  
Rückstand mit 200 ml Diethylether verrührt. Nach Dekan-  
tieren des Ethers vom ausgefallenen Niederschlag wird er-  
neut mit 5 ml Dimethylformamid versetzt und der beschrie-  
bene Vorgang wiederholt. Der erhaltene Niederschlag wird  
15 im Hochvakuum getrocknet und bei -20 °C unter Argon auf-  
bewahrt.

Ausbeute: 0,55 g (97%), tiefblaues Pulver

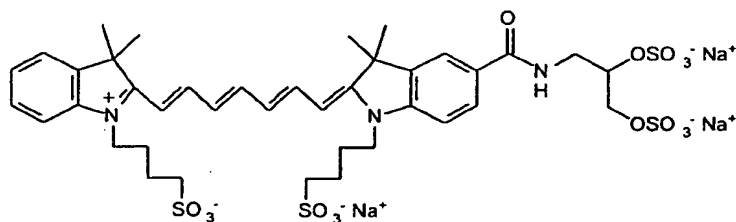
- 20 2) N-(2,3-Dihydroxy)propyl-1,1'-bis-(4-sulfobutyl)-  
indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz

0,5 g (0,61 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbo-  
cyanin-5-carbonsäure-N-hydroxy-succinimidylester in 20 ml  
25 Dimethylformamid werden mit einer Lösung von 0,15 g (0,92  
mmol) 2-Aminomethyl-5,5-dimethyl-1,3-dioxolan-hydrochlo-  
rid und 0,1 g (1,1 mmol) Triethylamin in 20 ml Dimethyl-  
formamid versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.  
Die Aufarbeitung erfolgt wie oben beschrieben. Das Roh-  
30 produkt wird in 30 ml Wasser/MeOH/Essigsäure (3:1:2) 18 h  
bei Raumtemperatur gerührt und die Lösung direkt einer  
chromatographischen Reinigung unterzogen (Europrep, 60-30  
C18, 60A, 20-45 µ, Laufmittel: Wasser / Methanol).

Ausbeute: 0,25 g (52%), blaues Lyophilisat

3) N-(2,3-Disulfato)propyl-1,1'-bis-(4-sulfobutyl)-  
indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Trinatriumsalz

0,25 g (0,32 mmol) N-(2,3-Dihydroxy)propyl-1,1'-Bis-(4-  
sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid werden  
zusammen mit 0,22 g (1,6 mmol) Schwefeltrioxid-Trimethyl-  
amin-Komplex in 15 ml Dimethylformamid 48 h bei Raumtem-  
peratur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft,  
mit Ether verrührt und der ausgefallene Feststoff chroma-  
tographisch gereinigt (Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45  $\mu$ ,  
Laufmittel: 0,5-proz. NaCl-Lösung/Methanol).  
Ausbeute: 0,20 g (64%), blaues Lyophilisat



15

 $\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 746 \text{ nm}$ 
 $\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 780 \text{ nm}$ 

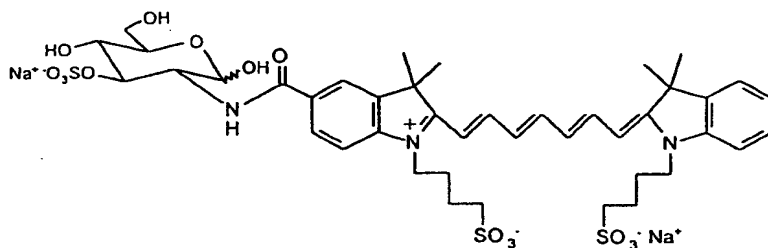
### Beispiel 2:

20

Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure-  
 $\alpha$ -D-glucosamid-3''-sulfat, Dinatriumsalz (2)

Zu einer Lösung von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-  
butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 0,1 g (1,0  
mmol) Triethylamin in 20 ml wasserfreiem Dimethylformamid  
werden 0,23 g (0,7 mmol) Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-  
tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) gegeben. Nach  
30 min Rühren bei Raumtemp. werden eine Lösung von 0,36 g  
(1,4 mmol)  $\alpha$ -D-Glucosamin-3-sulfat und 0,15 g (1,5 mmol)  
Triethylamin in 25 ml wasserfreiem Dimethylformamid zuge-  
tropft. Es wird weitere 3 h bei Raumtemp. gerührt, das

Lösemittel im Hochvakuum bei 40°C abgedampft und der Rückstand mit Diethylether verrührt. Der gebildete Feststoff wird abfiltriert und chromatographisch an RP-Kieselgel Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45  $\mu$ , Stufengradient: 100% 0,5-proz. NaCl-Lsg. -> 90% 0,5-proz. NaCl-Lsg / 10% Methanol -> 90% Wasser / 10% Methanol -> 50% Methanol) gereinigt und abschließend gefriergetrocknet.  
Ausbeute: 0,51 g (76%), blaues Lyophilisat



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 745 \text{ nm}$

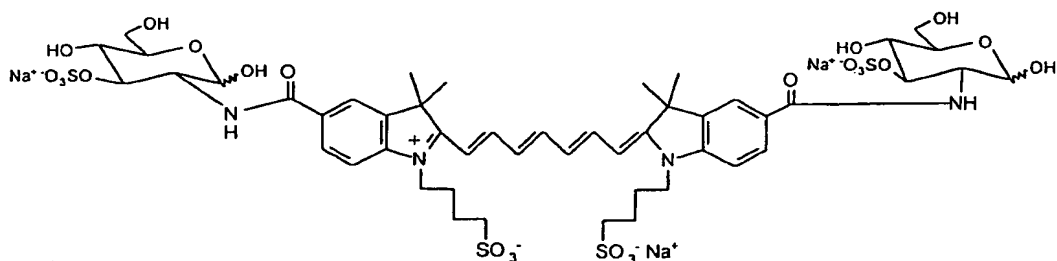
$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

### 15 Beispiel 3:

Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5,5'-dicarbonsäure-di- $\alpha$ -D-glucosamid-di-3'''-sulfat, Trinatriumsalz (3)

20 Die Darstellung und Reinigung erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend von 0,5 g (0,66 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5,5'-dicarbonsäure, 0,2 g (2,0 mmol) Triethylamin in 25 ml Dimethylformamid, Zugabe von 0,43 g (1,32 mmol) TBTU sowie 0,69 g (2,64 mmol)  $\alpha$ -D-Glucosamin-3-sulfat und 0,3 g (3 mmol) Triethylamin in 30 ml Dimethylformamid.

Ausbeute: 0,56 g (66%), blaues Lyophilisat



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 754 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 790 \text{ nm}$

5

#### Beispiel 4:

N-Chondrosin-Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz (4)

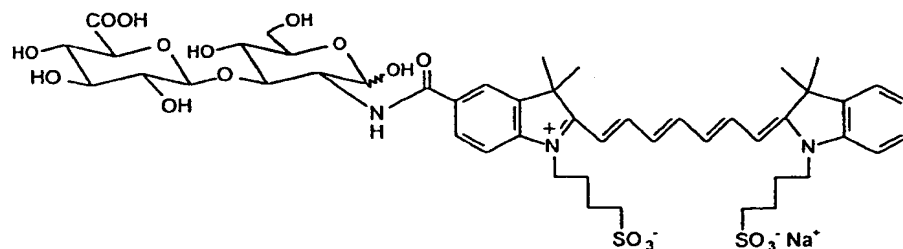
10

Die Darstellung erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure unter Verwendung von 0,43 g (1,2 mmol) Chondrosin. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Reinigung erfolgt mittels HPLC (Säule: 250x20 mm, Nucleosil 100C18, 7 mm, Eluens 50 mM Phospat-Puffer pH4 / MeOH, 5% auf 95% MeOH in 60 min) mit anschließender Entsalzung an RP-Kieselgel und Gefriertrocknung.

15

Ausbeute: 0,35 g (48%), blaues Lyophilisat

20



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 746 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

25

#### Beispiel 5:

## Maltotriose-Indotricarbocyanin-Addukt

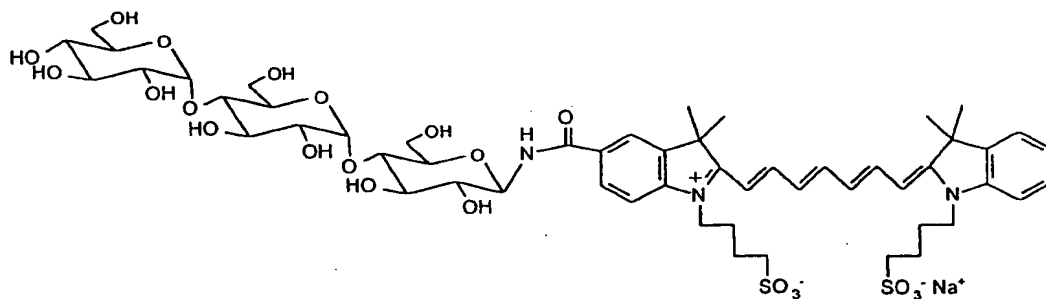
## 1) Darstellung von 1-Amino-1-deoxy-Maltotriose

5 0,2 g Maltotriose werden in 5 ml einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonat 7 Tage bei 30°C gerührt. Zur Entfernung überschüssigen Ammoniumhydrogencarbonats wird die Lösung bis zur Gewichtskonstanz mehrfach lyophilisiert.

10 2) Kopplung mit 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure

Eine Lösung von 0,1 g (0,14 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-  
butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 15 mg Triethylamin in 5 ml Dimethylformamid wird mit 0,05 g (0,15  
15 mmol) O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) versetzt und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 0,14 g (0,28 mmol) 1-Amino-1-deoxy-Maltotriose zugegeben und weitere 5 h bei  
20 Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Dimethylformamids bei 40°C im Hochvakuum wird der Rückstand mit Ether verrührt, abfiltriert und chromatographisch gereinigt (Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45  $\mu$ , Laufmittel: Wasser / Methanol). Ausbeute nach Gefriertrocknung 50%.

25



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 748 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

30

Beispiel 6:

## Heparin-Indotricarbocyanin-Addukt

- 5 0,25 g Heparin (niedermolekular, M ca. 6000 g/mol, Fa. Sigma) werden in Anlehnung an Nagasawa K. und Inoue Y. (Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. III, 1980, 291-294) partiell de-N-sulfatiert (25°C für 3 h ; Ausbeute 0,20 g).
- 10 0,10 g partiell de-N-sulfatiertes, niedermolekulares Heparin werden in 40 ml Phosphatpuffer (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,3) mit einer Lösung von 0,12 g (0,15 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidylester, Natriumsalz (siehe Beispiel
- 15 1) in 4 ml Dimethylformamid versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Es erfolgt eine Reinigung mittels Ultrafiltration mit dest. Wasser (Centriprep 3000, Fa. Amicon), Gefriertrocknung und 5-stdg. Trocknung bei 50°C im Hochvakuum.
- 20 Schwefelgehalt (Bestimmung mittels ICP-AES)
- |                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| S(%) Heparin                     | 11,55 |
| S(%) partiell de-N-sulfatiert    | 10,02 |
| S(%) nach Labeling mit Farbstoff | 10,89 |
- 25  $\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 750 \text{ nm}$   
 $\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 782 \text{ nm}$

30 Beispiel 7:Indotricarbocyanin-Cys- $\beta$ -Amyloid-Addukte

- 1) Darstellung von N-[3-(3-Maleimidobenzoyl)aminopropyl]-
- 35 bis-1,1'-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz

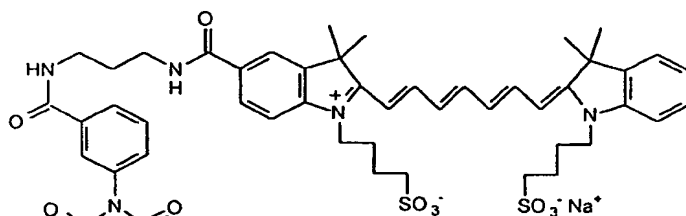
1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure wird in Anlehnung an bekannte Literaturverfahren durch Umsetzung mit 3-Aminopropyl-t-butylcarbammat, Freisetzung  
 5 der Aminogruppe durch saure Spaltung mit Trifluoressigsäure und Umsetzung mit 3-Maleimidobenzoesäurechlorid in o. g. Verbindung übergeführt.

#### 2a) Labeling von Cys- $\beta$ -Amyloid(1-40)

Alle Lösungsmittel sind durch Sättigung mit Argon vom Sauerstoff befreit.

10 mg lyophilisiertes Cys- $\beta$ -Amyloid(1-40) werden in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,8 / DMF (2:1-Gemisch) gelöst und mit  
 15 10 mg N-[3-(3-Maleimidobenzoyl)aminopropyl]-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz versetzt. Es wird 3 h bei Raumtemp. gerührt, mit 5 ml Wasser verdünnt und die Lösung lyophilisiert.

Reinigung mittels HPLC (Säule: Merck Select B, 5  $\mu$ ; Laufmittel: Wasser + 0,05% Trifluoressigsäure, Acetonitril)  
 20 ergibt 4 mg Produkt.



C DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGW

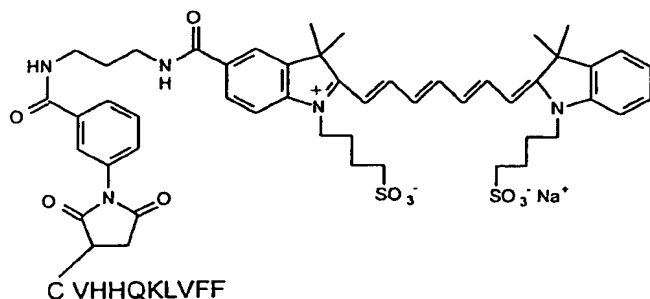
25  $\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 747 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 780 \text{ nm}$

#### 2b) Labeling von Cys- $\beta$ -Amyloid(12-20)

Die Umsetzung wird analog 2a) durchgeführt. 5 mg Cys- $\beta$ -Amyloid(12-20) werden mit 10 mg Farbstoff versetzt und 2,5 h bei Raumtemp. gerührt. Man erhält 6 mg Produkt nach Reinigung durch HPLC.

5



#### Beispiel 8:

10

Bindungsassay zur Messung der Bindung der Farbstoff-Konstrukte an  $\beta$ A4-Peptid durch Fluoreszenzdetektion

15

- 1) Herstellung der  $\beta$ A4-Peptid-beschichteten Membranen und Inkubation mit  $\beta$ A4-bindenden Farbstoff-Konstrukten

20

Der Bindungsassay erfolgte an  $\beta$ A4-Peptid-beschichteten Nitrocellulosemembranen (Cellulosenitrat-Membranfilter CN; 0,4  $\mu$ m, Fa. Schleicher&Schuell). Die Beschichtung der Membran erfolgte in einer Dot-Blot-Kammer (Fa. Strata-gene). Die Membran und das Blotting Papier (GB002, Fa. Schleicher&Schuell) wurde mit Wasser befeuchtet und in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl pH7,6; 127 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 0,01%  $\text{NaN}_3$ ) äquiliibriert.

25

Aus einer Lösung von  $\beta$ A4-Peptid in Wasser (2 mg/ml) wurden 10, 5 und 2,5  $\mu$ g Peptid in 0,2 ml TBST-Puffer auf die Membran appliziert. Nach 15 min. Inkubation wurde die Peptidlösung durch die Membran gesaugt, mit 0,2 ml TBST-Puffer nachgespült, die Membran aus der Dot-Blot-kammer entfernt und 30 min bei 37°C getrocknet.

30

Vor der Inkubation mit Farbstoffen wurde die getrocknete Membran unter leichtem Schütteln für zwei Stunden mit TBST-Block-Puffer (TBST, s. o.; 5% Milchpulver) inkubiert und anschließenden 5 min mit TBST-Puffer gewaschen.

- 5 Die Inkubation mit Farbstoffen erfolgte durch leichtes Schütteln der Membranen in 0,0005 - 0,05 %igen Lösungen des Farbstoffes in TBST. Danach wurde fünfmal mit TBST-Puffer gewaschen, die Membran bei Raumtemp. getrocknet und eingeschweißt.

10

## 2) Auswertung mittels Fluoreszenzdetektion

- Die laserinduzierten Fluoreszenzaufnahmen werden an einem experimentellen Fluoreszenzbildgebungssystem durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit monochromatischem Laserlicht der Wellenlänge 740 nm durch Auskopplung der Strahlung über ein Lichtleitersystem und homogene Ausleuchtung der Cellulosemembranen. Das reflektierte Anregungslicht wird durch einen Kantenfilter abgeblockt, das laserinduzierte Fluoreszenzlicht oberhalb 740 nm mit einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device) aufgenommen und die Daten als Schwarz-Weiß-Bilder gespeichert.
- 15 In Fig. 1 bis 2 sind Beispiele für Fluoreszenzaufnahmen der Membranen gezeigt.

25

### Fig. 1:

Fluoreszenzaufnahme der Cellulosemembran nach Inkubation mit Bis-1,1'-(4-Sulfo-butyl)indotricarbocyanin, Natriumsalz (0,005% Lsg.).

- 30 Anregungswellenlänge 740 nm, Detektion > 780 nm

1: 2,5 µg  $\beta$ -Amyloid(1-42)

2: 5 µg  $\beta$ -Amyloid(1-42)

3: 10 µg  $\beta$ -Amyloid(1-42)

- 4: Kontrollpeptide mit ähnlichen Bindungseigenschaften an die Cellulosemembran
- 35

Fig. 2:

Fluoreszenzaufnahme der Cellulosemembran nach Inkubation  
mit 4-[5-[3-Carboxy-3-hydroxy-1-(4-sulfophenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2,4-pentadienyliden]-4,5-dihydro-5-oxo-1-(4-  
5 sulfobutyl)-1H-pyrazol-3-carbonsäure, Dikaliumsalz  
(0,005% Lsg.)

Anregungswellenlänge 650 nm, Detektion > 680 nm

5: 2,5 µg β-Amyloid(1-42)

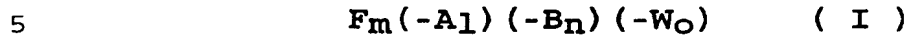
6: 5 µg β-Amyloid(1-42)

10 7: 10 µg β-Amyloid(1-42)

8: Kontrollpeptide mit ähnlichen Bindungseigenschaften an  
die Cellulosemembran

## Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens  
ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm  
aufweist,

A ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist,  
B ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist,  
W ein an  $\beta$ -Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles,  
niedermolekulares Strukturelement ist,

m für die Zahl 1 oder 2 steht oder, mit der Maßgabe,  
daß n und o Null bedeuten, für eine ganze Zahl 3 - 20  
steht,

l und n unabhängig voneinander für eine Zahl 0, 1  
oder 2 stehen,

o für eine ganze Zahl 0, 1, 2, 3 oder 4 steht,  
mit der Maßgabe, daß die Summe aus l, n und o  $\geq 1$  ist

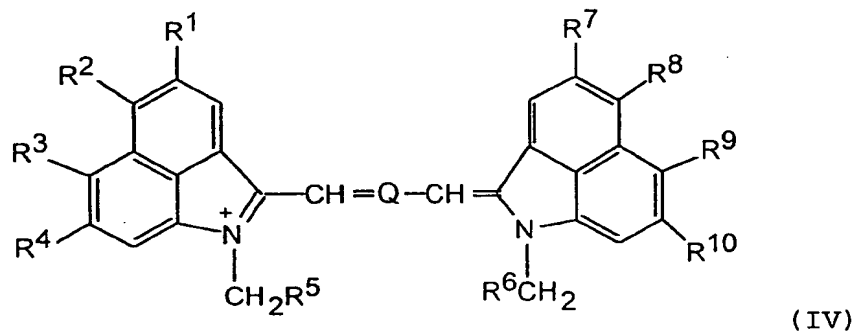
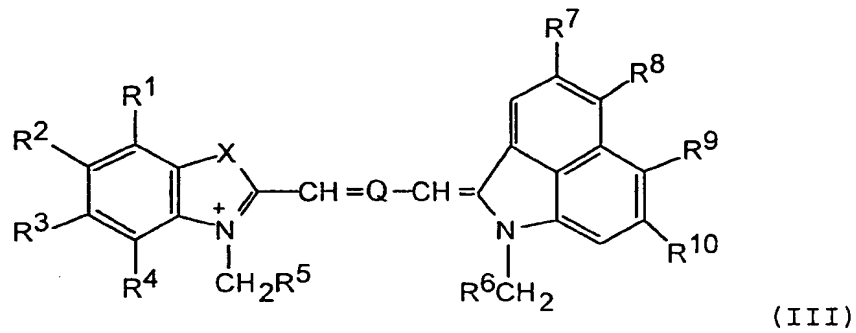
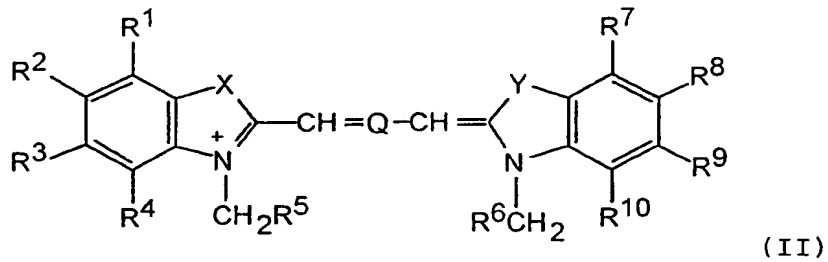
sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß in der allgemeinen Formel I

F für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-,  
Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

F für einen Cyanin-, Squarilium- oder Croconiumfarb-  
stoff der allgemeinen Formeln II - IV



5        worin

10        R<sup>1</sup> bis R<sup>4</sup> und R<sup>7</sup> bis R<sup>10</sup> unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COE<sup>1</sup>, -CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -NHCOE<sup>1</sup>, -NHCONHE<sup>1</sup>, -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -OE<sup>1</sup>, -OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>, -SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>, -SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>, -E<sup>1</sup>,

15        wobei E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegebenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>- oder bipyklische

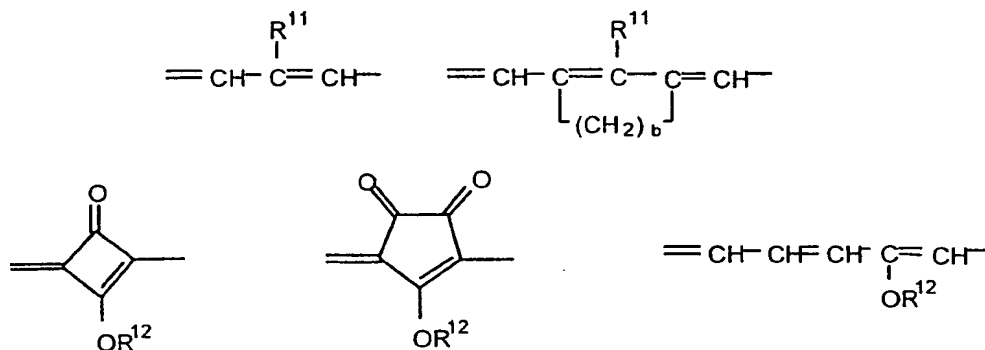
C<sub>10</sub>-Einheiten formen können, steht, und wobei die C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist,

stehen, und wobei jeweils benachbarte Reste R<sub>1</sub> - R<sub>4</sub> und/oder R<sub>7</sub> - R<sub>10</sub> unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

oder für eine Bindung an A, B oder W stehen,

R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> unabhängig voneinander für einen Rest -E<sup>1</sup> mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Sulfoalkylkette stehen,

Q ein Fragment



worin

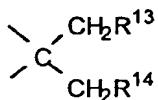
R<sup>11</sup> für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -OE<sup>1</sup> oder -E<sup>1</sup>, wobei E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> die oben angegebene Bedeutung haben, steht,

R<sup>12</sup> für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E<sup>1</sup> mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

darstellt,

X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



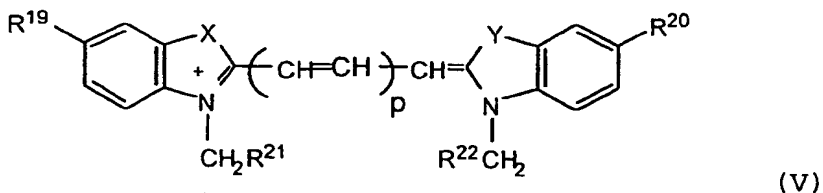
worin

R<sup>13</sup> und R<sup>14</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R<sup>13</sup> und R<sup>14</sup> unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können,

bedeuten,

steht.

4. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I  
F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel V



worin

p eine ganze Zahl 2 oder 3 bedeutet,

X und Y unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stehen,

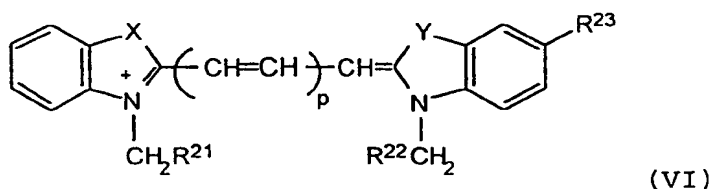
R<sup>19</sup> und R<sup>20</sup> unabhängig voneinander einen Rest  
 -COOE<sup>1</sup>, -CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -NHCOE<sup>1</sup>, -NHCONHE<sup>1</sup>, -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>,  
 -OE<sup>1</sup>, -OSO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -E<sup>1</sup>, wobei E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> die  
 oben angegebene Bedeutung haben, mit der Maßgabe,  
 daß E<sup>1</sup> und E<sup>2</sup> nicht gleichzeitig Wasserstoffatome  
 sind, darstellen,

R<sup>21</sup> und R<sup>22</sup> unabhängig voneinander für einen Rest  
 -E<sup>1</sup> mit der oben angegebenen Bedeutung, für eine  
 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Sulfoalkylkette

oder R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup>, E<sup>1</sup> oder E<sup>2</sup> für eine Bin-  
 dung an A, B oder W mit der oben angegebenen Be-  
 deutung stehen,

darstellt.

5. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-  
 zeichnet, daß in der allgemeinen Formel I  
 F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel VI



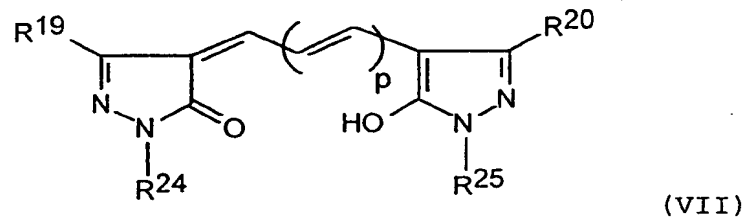
worin

p, X, Y, R<sup>21</sup> und R<sup>22</sup> die oben angegebene Bedeu-  
 tung haben,

R<sup>23</sup> für -OE<sup>3</sup>, -COOE<sup>3</sup>, -CONHE<sup>3</sup>, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-  
 NHE<sup>3</sup>, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-OE<sup>3</sup>, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-COOE<sup>3</sup> oder  
 -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-CONHE<sup>3</sup> steht, worin  
 E<sup>3</sup> für ein Mono-, Oligo- oder Polysaccharid mit  
 mindestens einem Rest -OSO<sub>3</sub>H steht,

darstellt.

6. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I F einen Oxonolfarbstoff der allgemeinen Formel VII,



10

worin

p, R<sup>19</sup> und R<sup>20</sup> die oben angegebene Bedeutung haben,

15

R<sup>24</sup> und R<sup>25</sup> unabhängig voneinander für einen einfach bis dreifach mit Hydroxy-, Carboxy-, Sulfat-, Sulfonat, Alkyl- oder Alkoxy- oder Carbonsäureesterresten substituierten Phenylring stehen,

20

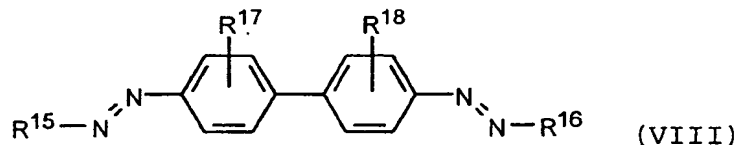
bedeutet.

7. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I
- 25 A für Antikörper, Antikörperfragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte
- 30 Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

8. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

B einen Diazofarbstoff der allgemeinen Formel VIII

5



worin

10 R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup> unabhängig voneinander für einen mit einer oder mehreren Hydroxy-, Carboxy-, Amino-, Sulfonsäure-, Alkoxycarbonyl-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Alkoxy-, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen im Alkylrest, oder Arylsulfonylgruppen, mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen im Arylrest, substitu-

15 ierten Phenyl- oder Naphthylrest, oder für einen Farbstoff F, steht,

20 R<sup>17</sup> und R<sup>18</sup> unabhängig voneinander für einen Hydroxy-, Carboxy-, Sulfonsäure-, Alkyl-, Alkoxyrest, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, stehen, darstellt.

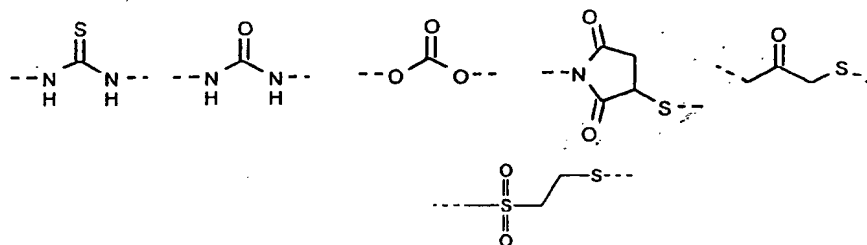
- 25 9. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

W für einen Rest -OSO<sub>3</sub>H oder -SO<sub>3</sub>H, einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest mit bis zu 60 C-Atomen, welcher mit bis zu 5 Hydroxygruppen, bis zu 3 Carbonsäuregruppen und mindestens einem Rest -OSO<sub>3</sub>H oder -SO<sub>3</sub>H substituiert ist,

30

steht.

10. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß F mit A, B  
5 und/oder W, unabhängig voneinander, über eine Ester-, Ether-, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe, Amidgruppe oder über eine Gruppe



10

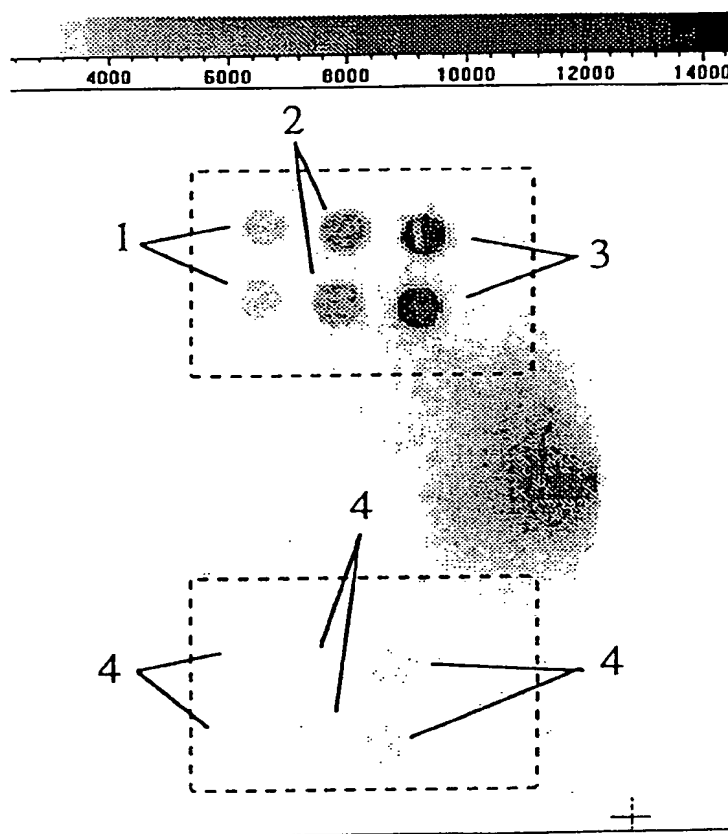
verknüpft ist.

11. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung.  
15

12. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vitro-Diagnostik neurodegenerativer Gewebe mittels NIR-Strahlung.  
20

13. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbindung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.  
25

Fig. 1



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 2

